

CARIÓTIPOS INÉDITOS DE *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) (BIVALVIA: VENERIDAE) E *Donax striatus* (LINNAEUS, 1767) (BIVALVIA: DONACIDAE) DE PRAIAS DO LITORAL POTIGUAR.

Marcos Antonio Nobrega de Sousa^{1*}; Edigleyce de Lima Costa², Naama Jéssica de Assis Melo², Mayra Joyce da Costa Pinheiro³, Renata Keli da Silva⁴

¹Docente Adjunto. Departamento de Ciências Animais (DCAN). Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

*Correspondência: Avenida Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900. Email:

marcossousa@ufersa.edu.br

²Biotecnologistas, Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

³Graduanda em Biotecnologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

⁴Graduanda em Ecologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

RESUMO

A maricultura está em expansão e são poucos os estudos sobre moluscos nativos, incluindo os que podem elucidar a taxonomia sobre as espécies brasileiras. As informações citogenéticas podem ser importantes para auxiliar na identificação das espécies. O objetivo deste trabalho foi identificar os cariótipos de *Anomalocardia brasiliiana* e *Donax striatus*. Para isso foram realizadas coletas em setembro de 2011, e em fevereiro e abril de 2012 nas praias de Barra, Pernambucoquinho e Alagamar, em Grossos, RN, e na Praia das Emanuelas, em Tibau, RN. As brânquias foram retiradas e a suspensão celular foi preparada *in vitro*, hipotonizada, fixada com carnoy, e gotejada em lâminas de microscopia posteriormente coradas com Giemsa. As lâminas foram analisadas e as melhores metáfases foram fotografadas em microscópio óptico com câmera digital. Os cromossomos foram recortados, agrupados e classificados de acordo com o índice centromérico para obtenção do número diploide (2n) e número fundamental (NF). O número diplóide encontrado para *A. brasiliiana* foi 2n= 14 e NF= 22 com cariótipo composto por quatro pares de cromossomos submetacêntricos e três pares acrocêntricos dispostos em ordem decrescente de tamanho, sendo o último, um par diminuto. Para *D. striatus*, o número diploide encontrado foi 2n=16 e NF=16, com oito pares acrocêntricos. Embora não tenham sido distinguidos morfológicamente os cromossomos sexuais em nenhuma espécie estudada, este trabalho traz dados citogenéticos inéditos para essas espécies.

Descritores: Moluscos, Cromossomos, Nordeste, Brasil.

CARIÓTIPOS INÉDITOS DE *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) (BIVALVIA: VENERIDAE) E *Donax striatus* (LINNAEUS, 1767) (BIVALVIA: DONACIDAE) DE PRAIAS DO LITORAL POTIGUAR.

ABSTRACT

The mariculture is expanding and there are few studies on native mollusks, including those that may elucidate the taxonomy of Brazilian species. Cytogenetic information is important to assist in species identification. The objective of this study was to identify the karyotypes of *Anomalocardia brasiliiana* and *Donax striatus*. For this collection in September 2011, and February and April 2012 were held on the of Barra, and Pernambucoquinho Alagamar beaches in Thick, RN, and the Emanuelas Beach, in Tibau, RN. The gills were removed and the cell suspension was prepared *in vitro*, hipotonizada, fixed with Carnoy and dropped later on microscope slides stained with Giemsa. Slides were analyzed and the best metaphases were photographed under a light microscope with digital camera. The chromosomes were cut out, grouped and classified according to the centromeric index to obtain the diploid number (2n) and fundamental number (NF). The diploid number found in *A. brasiliiana* was 2n = 14 and NF = 22 with karyotype consist of four pairs of submetacentric chromosomes and three acrocentric pairs arranged in descending order of size, the last one being a miniature pair. For *D. striatus*, the diploid number was 2n = 16 and FN = 16, with eight acrocentric pairs. Although not morphologically distinguishable sex chromosomes in any species studied, this work brings unpublished cytogenetic data for these species.

Keywords: Molluscs, Chromosomes, Northeast, Brazil.

INTRODUÇÃO

O filo Mollusca é um dos mais conhecidos e o segundo maior filo animal em número de espécies (1). Neste filo estão incluídos as ostras, os caramujos, as lesmas, os mexilhões, os polvos e as lulas (2).

Estudos sobre os moluscos marinhos tem sido realizados sob diferentes aspectos, desde levantamentos sistemáticos até a prospecção de substâncias bioativas. Apesar do grande interesse humano na utilização desses animais, a quantidade de pessoas que já se dedicaram a estudá-los é proporcionalmente pequena, e ainda é necessário muito conhecimento a ser gerado (1).

A classe Bivalvia é a mais representativa em termos de biomassa nos diversos sistemas hidrográficos (3), com cerca de 20 mil espécies (1) e 114 famílias. Para o Brasil são registradas 410 espécies pertencentes a aproximadamente 69 famílias (4).

Por serem filtradores, são comumente utilizados como monitores de poluição (5-6). São bastante sensíveis a pisoteio, à poluição orgânica e química, à eutrofização e ao soterramento do seu ambiente. Quando submetidos a alguma perturbação no ambiente onde vivem, os bivalves não voltam a ocupá-lo (7).

Muitas espécies de bivalves presentes em áreas intermareais são utilizadas como fonte de alimento pela espécie humana e têm sido amplamente coletadas em várias regiões do Brasil (8). Eles também são apreciados pela possibilidade de suas conchas serem utilizadas para a confecção de enfeites no artesanato (9).

A família Veneridae (Bivalvia) reúne aproximadamente 500 espécies viventes, pertencentes a 50 gêneros e 12 subfamílias. A espécie *Anomalocardia brasiliiana* Gmelin, 1791 pertencente à família Veneridae é um bivalve lamelibrânquio de ampla distribuição, sendo comumente encontrado ao longo de toda a costa brasileira, com distribuição desde as Índias Ocidentais até o Uruguai (10). É bastante utilizada na alimentação humana e tem também grande potencial para o cultivo (11). A espécie é vulgarmente conhecida por diferentes nomes como “berbigão”, “maçunim”, “chumbinho”, “sarro de pito”, “mija-mija” ou “vôngole” (12).

Essa espécie é um organismo filtrador que retira o seu alimento da água, devido ao movimento dos cílios das brânquias, que permite a entrada de água com partículas de alimento. Essa forma de alimentação propicia uma ingestão maior de matéria orgânica e inorgânica, que vem junto com o alimento (13).

Nos municípios de Grossos e Tibau, RN, as “marisqueiras”, mulheres dos pescadores que trabalham coletando moluscos bivalves na maré baixa do estuário nas praias de Barra, Pernambuquinho, Alagamar e Emanuelas coletam *A. brasiliiana* e a

utilizam na alimentação ou comercialização, constituindo muitas vezes, a principal fonte de renda familiar.

Esse aspecto socioeconômico que a *Anomalocardia brasiliiana* abrange nessa e em outras comunidades, associado à importância que esses organismos exercem no ambiente marinho tem contribuído para vários estudos sobre esta espécie. Diante disso, existem estudos voltados para o ciclo reprodutivo da *A. brasiliiana*(9,14); para a caracterização genética de quatro populações da espécie usando sequências parciais do gene COI de DNA mitocondrial (15); para os organismos que se associam em simbiose com *A. brasiliiana*(11); a avaliação das relações alométricas do crescimento e peso da espécie (16); a variação morfológica das conchas em diferentes ambientes (17); na comparação de alguns parâmetros hemato-imunológicos em populações de *A. brasiliiana* para o monitoramento da qualidade ambiental de uma reserva extrativista marinha (18); alguns autores analisaram também a distribuição e a densidade da espécie em praias da Costa Branca do Rio Grande do Norte (19) e outro estudou a estrutura da população (20). Entretanto, não há registro na literatura de estudos citogenéticos desta espécie.

Os bivalves da família Donacidae são organismos dominantes capazes de habitar praias arenosas expostas, um ambiente altamente energético (21-22), e, como consequência, são capazes de alcançar altas densidades populacionais em algumas áreas. Esses moluscos também são um importante recurso econômico em vários países. Apesar da sua abundância limitada, as espécies de *Donax* mostram uma forte radiação adaptativa de acordo com a mudança das marés, habitando a zona intermareal rasa (23).

Os bivalves da espécie *Donax striatus* Linnaeus, 1767 vivem enterrados logo abaixo da superfície, sempre em posição vertical ao substrato. São a base alimentar de várias outras espécies carnívoras, que perfuram sua concha e consomem sua carne. Sua gama de distribuição começa em Gibara, Cuba e no Brasil, atinge os estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Maranhão (24).

Esses animais despertam interesse principalmente por sua capacidade pouco comum de desenvolver e manter enormes populações em ambientes relativamente instáveis de praias arenosas com forte hidrodinamismo. Nas praias de Tibau e Grossos, RN, os indivíduos de *D. striatus* são utilizados para fazer produtos artesanais pelos habitantes do local para serem comercializados em cidades vizinhas, bem como na alimentação, com a grande vantagem de ser uma fonte de proteína animal, facilmente obtida e de baixo custo (25).

Uma forma de estudar os moluscos bivalves é através da citogenética, que permite descrever o número de cromossomos de uma célula ou organismo. O estabelecimento da identidade cromossômica pode ser usado em vários estudos (mapa genômico, taxonomia, etc.), mas possui importância fundamental na caracterização do número e morfologia cromossômica (26).

A contagem de cromossomos e a análise dos cariótipos inicialmente nos estudos de bivalves sempre foi realizada através da observação de cromossomos em meiose I e II obtidos de ovos libertados, gônadas masculinas ou divisões mitóticas iniciais no embrião. Entretanto, já existe um método para obter cromossomos metafásicos a partir do tecido das brânquias, que agora é amplamente utilizado (27).

Dessa forma, foi reportado o número cromossômico de todos os grupos aquáticos de moluscos. Nos grupos estudados, os números tendem a ser relativamente constantes dentro das famílias, com os seguintes números haploides modais: ostras (N=10), mexilhões (N=14) e vieiras (N=19) (28).

Os rearranjos cromossômicos podem ter função direta na especiação e a evolução cariotípica pode estar relacionada com a evolução morfológica. Uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se deseja comparar citogeneticamente espécies diferentes, examinar a variação de indivíduos de uma mesma espécie ou detectar variação geográfica. Além disso, com o auxílio de técnicas moleculares associadas à genética é possível aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade de espécies brasileiras, numa intercessão entre a Biotecnologia e a Ecologia (29).

Os principais métodos utilizados na citogenética vão de técnicas simples (contagem de cromossomos, montagem de cariótipo), aqueles que usam uma coloração diferencial (Banda C, Banda N, Banda G, Fluorocromos A/T específicos - DA/DAPI, Fluorocromos G/C específicos - CMA, MM, Regiões Organizadoras de Nucléolos - RONS) até as mais sofisticadas (hibridização *insitu*, cromossomos politênicos) (30).

As técnicas simples são bastante informativas, de modo que o número, tamanho e forma dos cromossomos são analisados para obter comparações interespecíficas. A técnica consiste na obtenção de um material rico em divisões celulares (mitóticas e meióticas) que é tratado com colchicina para o enriquecimento das células em divisão. Esse material é esmagado permitindo a liberação dos cromossomos em metáfase da célula, onde posteriormente os cromossomos são corados e analisados ao microscópio (30).

Deste modo, os estudos cromossômicos têm sido utilizados para caracterização padrão das espécies, na descrição da variação intrapopulacional, em comparações entre populações, caracterização de variação geográfica, ocorrências de clines ou correlações com o ambiente, correlação de variáveis genéticas com variáveis morfológicas ou fisiológicas, comparações interespecíficas e inferências filogenéticas (30).

Apesar da existência de pesquisas da citogenética de algumas famílias de moluscos - Arcidae (31-32), Pteriidae (32-33), Ostreidae (33-34), Pectinidae (35-36), Mutelidae (37), Mytilidae (38-39), Veneridae (31,40), Unionidae (37,41) – estes organismos ainda são poucos estudados.

Nesse contexto, os moluscos se apresentam como um grupo de organismos que precisam ser estudados citogeneticamente, pois permite obter dados referentes ao número e morfologia cromossômica desses animais possibilitando estudar a sua citotaxonomia.

Como parte destes estudos, podem-se destacar as famílias Veneridae e Donacidae de moluscos que podem ser encontradas no município de Grossos e Tibau, RN (42) e apresentam espécies ainda não caracterizadas citogeneticamente.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi descrever os cariótipos das espécies *Anomalocardia brasiliiana* e *Donax striatus* provenientes de praias do município de Grossos e Tibau, RN.

METODOLOGIA

Foram utilizados espécimes da família Veneridae e Donacidae coletados na região litorânea oeste do Rio Grande do Norte, Brasil, que corresponde à região estuarina do rio Apodi/Mossoró, nas localidades de Barra (4°56'30,17"S 37°09'13,74"O), Pernambuquinho (4°54'37,20"S 37°10'43,44"O), Alagamar (4°53'21,11"S 37°12'20,55"O), no município de Grossos, RN, e Praia das Emanuelas (4°49'51,20"S 37°14'36,48"O), em Tibau, RN (Figura 1). A região é denominada de Costa Branca, sendo o único lugar do Brasil que a caatinga, caracterizada por clima e vegetação de semiárido, encontra o mar (43).

As coletas foram realizadas nos meses de setembro de 2011, fevereiro e abril de 2012. Em cada coleta, cerca de quatro indivíduos por espécie foram trazidos para o laboratório e cerca de 1-2 dos animais coletados foram utilizados para preparações cromossômicas, pois a taxa de sobrevivência fora do ambiente natural foi baixa.

Os espécimes com tamanho de 1,5 a 3 cm de comprimento (adultos) foram coletados manualmente em substratos arenoso-lodosos na região de maré baixa (altitude - 0.0 a 0.9 m). Foram acondicionados em recipientes contendo água do mar e, em seguida, transportados para o Laboratório de Genética e Evolução (LAGENE) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Em laboratório, os espécimes foram mantidos nos recipientes ligados a aeradores, permitindo a sobrevivência dos animais até o início da preparação cromossômica. Cada animal preparado foi eutanasiado segundo princípios humanitários.

Todos os exemplares das espécies foram classificados taxonomicamente de acordo com a literatura especializada (44) e identificados com o auxílio de um especialista em malacologia.

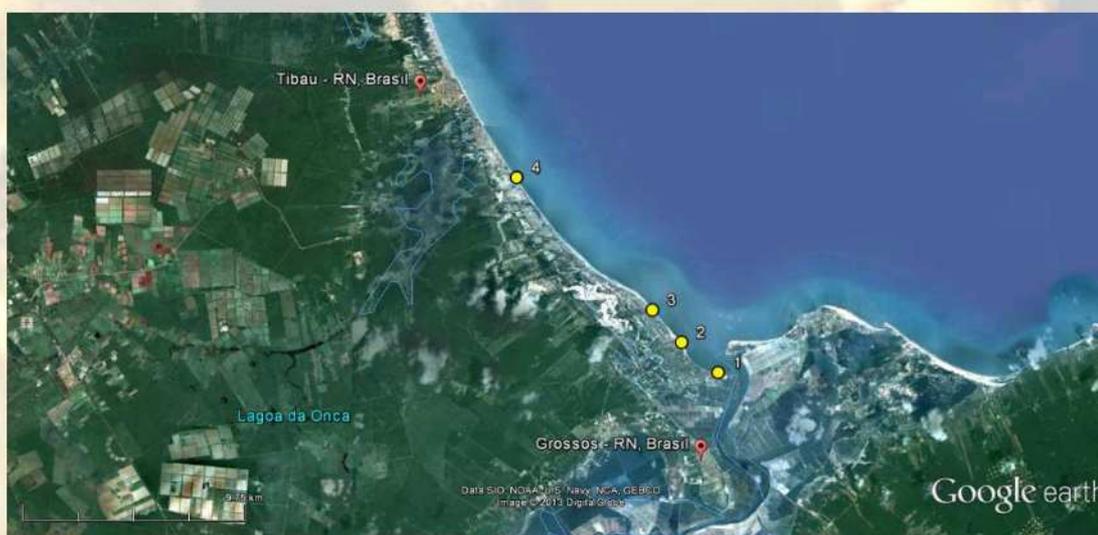


Figura 1. Mapa da área de estudo, destacando as praias de Barra (1), Pernambucozinho (2), Alagamar (3) em Grossos, RN e Praia das Emanuelas (4), em Tibau, RN (Fonte: Google Earth, 2014).

A obtenção de células *in vitro* foi realizada de acordo com a literatura especializada, realizando algumas modificações (45). Os exemplares foram anestesiados com o auxílio do anestésico benzocaína na concentração de 1ml/litro de água (46).

A anestesia garantiu que os animais não sofressem durante a retirada da hemolinfa e brânquias (tecido com maior taxa de divisão celular). Os espécimes tiveram seus tecidos dissecados e células dissociadas em uma mistura de nutrientes Ham's F-12. A suspensão foi colocada em 5 ml de meio de cultura a 28°C, por duas horas. Passado este tempo, adicionou-se uma gota de solução de colchicina a 0,005%, permanecendo a incubação por 45 minutos. Seguiu-se uma centrifugação por 10

minutos e descartou-se o sobrenadante. A solução hipotônica usada foi somente água destilada, por 40 minutos e o material foi fixado em carnoy: metanol e ácido acético (3:1) com três trocas, uma a cada 10 minutos. A suspensão celular foi pingada em lâminas de microscopia aquecidas a 60°C e secas ao ar.

Para a coloração, as lâminas foram hidrolisadas em HCl 1 N, a 60°C, por 7 minutos e lavadas em água destilada. Foram coradas em solução de Giemsa 1:30 em solução tampão fosfato pH 6,8 por 7 minutos e depois foram lavadas com água destilada e colocadas pra secar ao ar.

As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico. Uma quantidade mínima de cinco lâminas foi analisada para cada espécime coletado. Foram analisadas no mínimo 10 metáfases por exemplar para cálculo do número modal para estabelecimento do número diploide. As melhores metáfases coradas foram selecionadas com base na boa definição morfológica e nítida contagem dos cromossomos e foram fotografadas em microscópio em objetiva de imersão, com aumento de 1000x acoplado a uma câmera digital com resolução de 12 megapixels.

As fotografias foram editadas no programa de imagem gratuito gimp para corrigir densidade, contraste, entre outros aspectos, recortar os cromossomos e agrupá-los de acordo com a literatura especializada, quando possível, ou de acordo com a ordem decrescente de tamanho e morfologia, quando não disponível na literatura. Após a montagem, os cariótipos foram analisados levando-se em consideração o número e morfologia de cromossomos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados citogenéticos de uma espécie são muito informativos, sobretudo para estudos com objetivos de comparações interespecíficas, nos quais normalmente examinam-se o número, o tamanho e a forma (posição do centrômero e/ou presença e posição de constrições) dos cromossomos metafásicos, buscando encontrar diferenças e semelhanças entre espécies (30).

O número diploide encontrado para *Anomalocardia brasiliiana* foi $2n=14$ e o número fundamental foi $NF=22$. O cariótipo foi composto por quatro pares de cromossomos submetacêntricos e três pares acrocêntricos dispostos em ordem decrescente de tamanho, de acordo com o índice centromérico, sendo o último um par diminuto (Figura 2). Estes dados citogenéticos fornecem informações inéditas na literatura para esta espécie.

Também não foi possível distinguir morfologicamente os cromossomos sexuais desta espécie. Este fato corrobora a informação existente na literatura de que esta espécie não apresenta dimorfismo sexual pelas características anatômicas externas. Sendo possível diferenciar machos e fêmeas apenas por análise histológica pelas diferenças existentes nos tecidos gonadais (14).



Figura 2. Cariótipo de *Anomalocardia brasiliiana* ($2n=14$, $NF=22$). Barra=1 μ m.

O cariótipo encontrado para *Donax striatus*, inédito na literatura, apresentou número diploide $2n=16$ e número fundamental $NF=16$, o cariótipo é composto por oito pares acrocêntricos médios, classificados de acordo com o índice centromérico e dispostos em ordem decrescente de tamanho. Não foram distinguidos morfologicamente os cromossomos sexuais e outro fato a observar é o pequeno tamanho dos cromossomos, mesmo no microscópio com aumento de 1000x (Figura 3).

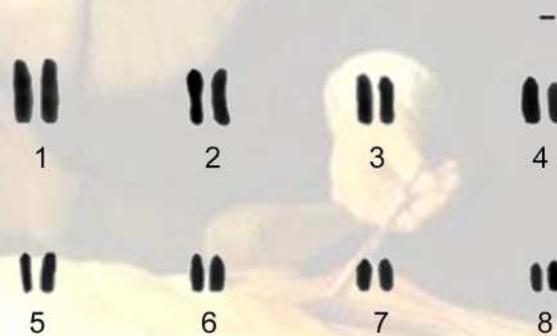


Figura 3. Cariótipo de *Donax striatus* ($2n=16$, $NF=16$). Barra = 1 μ m.

Apesar da preparação cromossômica utilizada ter permitido encontrar o número diplóide das espécies *Anomalocardia brasiliiana* e *Donax striatus* a morfologia encontrada ainda não está totalmente adequada, comparada a de outras espécies da família Veneridae e Donacidae, encontradas na literatura (47-53).

O número cromossômico mais frequente na família Veneridae é $2n=38$. O número fundamental (NF) não é indicado nos estudos que caracterizam geneticamente

as espécies da família Veneridae, são existentes apenas informações de *Mercenaria mercenaria* com $NF=76$ (54-56).

A diferença no número diplóide entre a *Anomalocardia brasiliiana* ($2n=14$) e as espécies caracterizadas citogeneticamente da sua família ($2n=38$) provavelmente ocorre devido à grande distância geográfica entre as populações de bivalves dos continentes analisados e as correntes marinhas.

O primeiro registro de estudo citogenético para espécies da família Donacidae trata-se da caracterização apenas do número cromossômico de *Donax variabilis*, que revelou o número cromossômico $2n=38$ (47).

Outro membro da família Donacidae que teve seus cromossomos estudados foi *Donax trunculus*, com espécimes coletados na França, na costa do oceano Atlântico. *D. trunculus* apresentou $2n=38$ e $NF=70$, com o cariótipo composto por 19 pares de cromossomos, nove metacêntricos, sete submetacêntricos e três subtlocêntricos (50). Este número diploide e número fundamental coincide com o encontrado para a mesma espécie, com espécimes coletados na região da Galícia, Espanha (52).

Contudo, a morfologia dos cromossomos encontrados no presente trabalho foi diferenciada, consistindo de nove pares metacêntricos, dois submetacêntricos-metacêntricos, sete submetacêntricos e um telocêntrico.

Observa-se que o número cromossômico $2n=38$ é o mais frequente entre os bivalves, especialmente na subclasse Heterodonta. A diferença cariotípica entre *D. striatus* e as variedades de *D. trunculus* ocorre provavelmente devido à grande distância geográfica entre as populações de bivalves dos continentes analisados, as correntes marinhas e pelo comportamento sésil, típico destes organismos, o qual confere isolamento entre as populações (57).

CONCLUSÕES

Este trabalho traz dados cromossômicos inéditos para estes organismos, aumentando o conhecimento da citotaxonomia dessas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simone LRL. Filo Mollusca. In: Migotto AE, Tiago CG. (Org.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX: Invertebrados Marinhos. 1ª ed. São Paulo: Fapesp, 1999; 3: 129-136.
2. Alves R, Magalhães AR. M. Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras para o estudo do cariótipo. Biotemas. 2010; 23 (1):111-119.

3. Mansur MCD, Shultz C, Garces L, Pares MM. Moluscos Bivalves de água doce: Identificação do gênero do Sul e Leste do Brasil. *Acta Biol. Leopold.* 1987; 9 (2): 181-202.
4. Amaral ACZ, Jablonski S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade.* 2005; 1 (1): 43-51.
5. Fittkau EJ. Armut in der Vielfalt. Amazonien als Lebensraum für Weichtiere. *Mitteilungen der Zoologischen Gesellschaft.* 1981; 13 (3): 329-343.
6. Mansur MCD, Valer RM, Aires NCM. Distribuição e preferências ambientais dos moluscos bivalves do açude do Parque de Proteção Ambiental Copesul, Município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências.* 1994; 2 (1): 27-45.
7. Mansur MCD, Castillo AR, Brasil LG, Querol E, Querol MVM. Moluscos bivalves da localidade de São Marcos, bacia do Médio rio Uruguai, Uruguiana, Brasil. *Biotemas.* 2007; 20 (4): 73-79.
8. Araújo CM. Biologia reprodutiva do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), Estado de Santa Catarina, Florianópolis. [Tese]. Universidade de São Paulo, 2001.
9. Barreira CAR, Araújo MLR. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará Brasil. *Bol. Inst. Pesca.* 2005;31 (1): 9-20.
10. Rios, E. C. Seashells of Brazil. Edª Rio Grande. 1994. 492p.
11. Boehs G, Magalhães ARM. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 2004; 21 (4): 865-869.
12. Narchi W. Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). *Bull. Mar. Sci.* 1972; 22: 644-670.
13. Poli CR, Poli ATB, Andreatta E, Beltrame EA (orgs.). *Aquicultura: Experiências Brasileiras.* Florianópolis: Mutitarefa, 2004. 456 p.
14. Grotta M, Lunetta JE. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) do litoral do estado da Paraíba. *Rev. Nordestina Biol.* 1980; 3 (1): 5-55.
15. Arruda CCB, Beasley CR, Vallinoto M, Marques-Silva NS, Tagliaro CH. Significant genetic differentiation among populations of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791): A bivalve with planktonic larval dispersion. *Genet. Mol. Biol.* 2009; 32 (2): 423-430.
16. Souza AB. RELAÇÕES ALOMÉTRICAS DA *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) NA PRAIA DE MANGUE SECO, PERNAMBUCO-BRASIL. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.
17. Estrada TEMD. Variação morfológica de conchas de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) em praias de diferentes condições ambientais no sudeste do Brasil. [Dissertação]. Instituto de Biologia. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
18. Mello DF. Utilização de marcadores imunológicos no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* para o monitoramento da qualidade ambiental da Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé, Florianópolis/SC.[Monografia]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
19. Belém TP, Moura RST, Henry-Silva GG. Distribuição e densidade do bivalve *Anomalocardia brasiliiana* em praias do Rio Grande do Norte durante um período de pluviosidade atípica. *Biotemas.* 2013; 26 (1): 109-122.
20. Oliveira IB. Estudo da estrutura populacional do marisco *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) na praia de mangue seco, litoral norte de Pernambuco-Brasil. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2010.
21. Ansell AD. The biology of the genus *Donax*. *Junk Publishers, Sandy Beaches as Ecosystems,* 1983; 19: 607-636.
22. Brown AC, McLachlan A. *Ecology of sandy shores.* 2ª ed., Elsevier, 1990.
23. Laudien J, Brey T, Arntz WE. Population structure, growth and production of the surf clam *Donax serra* (Bivalvia, Donacidae) on two Namibian sandy beaches. *Est. Coast. Shelf Sci.* 2003; 58: 105 – 115.
24. Wade BA. On the taxonomy, morphology, and ecology of beach clam, *Donax striatus* Linné. *Bull. Mar. Sci.* 1967; 17 (3): 723 – 740.

25. Borges-Azevedo CMS, Moura Neto EL, Silva JS. Densidade populacional de *Donax striatus* Linnaeus, 1767 (Bivalvia: Donacidae) na praia de Tibau, Grossos, Rio Grande do Norte. *Caatinga*. 1990; 7: 63 – 75.
26. Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature of centromeric positions on chromosomes. *Hereditas*. 1964; 52: 201-220.
27. Thiriou-Quiévreux C, Ayraud N. Les caryotypes de quelques espèces de Bivalves et de Gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 1982; 70: 165-172.
28. Thiriou-Quiévreux C. Advances in cytogenetics of aquatic organisms. In: Beaumont A, editor. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. London Chapman and Hall, 1994.
29. White TCR. The importance of a relative shortage of food in animal ecology. *Oecol.* 1978; 33: 71-87.
30. Klaczko, L. B. Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a biodiversidade genética no Brasil. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 2000. 55 p.
31. Wang J, Zhao X, Zhou L, Xiang J. Karyotypes of three species of marine bivalve molluscs. *Acta Oceanol. Sin.* 1998; 20: 102-107.
32. Ebied AM. Chromosomal studies of four Egyptian marine species of the families Pteriidae and Arcidae. *Cytologia*. 1999; 64: 149-157.
33. Márquez EG. Comparacion de cariótipos entre las ostras *Crassostrea virginica* (Gmelin), *C. rhizophorae* (Guilding) y *Pinctada imbricata* (Röding). *Caribb. J. Sci.* 1992; 28: 51-55.
34. Leitão A, Boudry P, Labat JP, Thiriou-Quiévreux C. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia*, 1999; 41: 175-186.
35. Xiang QY, Soltis DE, Morgan DR, Soltis PS. Phylogenetic relationships of *Cornus* L. sensu lato and putative relatives inferred from *rbcl* sequence data. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1993; 80:723–734.
36. Basoa E, Alfonsi C, Perez JE, Cequean H. Karyotypes of the scallops *Euvola ziezae* and *Nodipecten nodosus*, from the Gulf of Cariaco, Sucre State, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 2000; 39: 49-54.
37. Ebied AM. Karyological studies on three Egyptian freshwater species of order *Eulamelli branchiata* (Bivalvia-Mollusca). *Cytologia*; 1998; 63: 17-26.
38. Insua A, Labat JP, Thiriou-Quiévreux C. Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Molluscan Stud.* 1994; 60: 359-370.
39. Torreiro A, Martínez-Expósito MJ, Trucco MI, Pasantes JJ. Cytogenetics in *Brachidonte rodriguezii* d'Orb. Bivalvia, Mytilidae. *Chromosome Res.* 1999; 7: 49-55.
40. Insua A, Thiriou-Quiévreux C. Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboids* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquat. Living Resour.* 1992; 5: 1-18.
41. Wang XJ, Wang YJ, Shi AJ, Wang XZ. Research on chromosomes of *Hyriopsis cumingii*. *J. Sichuan Univ. Eng. Sci. Ed.* 2000; 37: 252-256.
42. Matthews HR, Matthews HC. Nota preliminar sobre a fauna de invertebrados da praia de Tibau, Estado do Rio Grande do Norte. *Caatinga*. 1976; 1 (1): 57-64.
43. Nascimento SR. Geoprocessamento aplicado à gestão de informações territoriais do município de Grossos-RN estudo multitemporal do uso e ocupação do solo. 2004. 98 f. [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2004.
44. Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS, Dewey TA. The Animal Diversity Web (online). Disponível em: <<http://animaldiversity.org>>. Acesso em: Março, 2013.
45. Fenocchio AS, Venere PC, Cesar AC, Dias AL, Bertollo LAC. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*. 1991.44: 161-166.
46. Araújo AF. Avaliação de anestésicos para a ostra perliífera nativa *Pteria hirundo* (Linné, 1758) [Relatório de Conclusão de Estágio Supervisionado II]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
47. Menzel RW. Chromosome number in nine families of marine pelecypod mollusks. *Nautilus*. 1968; 82 (2): 45–50.
48. Rassotto M, Altieri D, Colombera DI. Chromosomi spermatocitari di 16 species appartenenti alla classe pelecypoda. *Atti. Congr. Soc. Malac.* 1981; 9: 113-127.

49. Corni MG, Trentini M. A chromosome study of *Chamela gallina* (L.) (Bivalvia, Veneridae). B. Zool. 1986; 53: 23–24.
50. Cornet M, Soulard C. Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). Genetica, 1990; 82 (2): 93-97.
51. Ebied ABM, Aly FM. Cytogenetic Studies on Metaphase Chromosomes of Six Bivalve Species of Families Mytilidae and Veneridae (Nucunelloidea, Mollusca). Cytologia. 2004; 69 (3): 261-273.
52. Martínez A, Mariñas L, González-Tizón A, Méndez J. Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) by means of karyotyping, fluorochrome banding and fluorescent *in situ* hybridization. J. Molluscan Stud. 2002; 68: 393-396.
53. Amar G, Rojas CP, Brand EV, Jara-Seguel P. Karyotype study in the surf clam *Mesodesma donacium* Lamarck, 1818 (Bivalvia: Veneroidea: Mesodesmatidae). Gayana. 2008;72 (1): 18-22.
54. Wang Y, Guo X. Chromosomal mapping of the vertebrate telomeric sequence (TTAGGG)*n* in four bivalve mollusks by fluorescence *in situ* hybridization. J. of Shellfish Res. 2001; 20: 1187-1190.
55. Wang Y, Guo X. Chromosomal mapping of major ribosomal rRNA genes in the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) using fluorescent *in situ* hybridization. Mar. Biol. 2007; 150 (6): 1183-1189.
56. Zhi-Hua L, Zhen-Ming L, Xue-Liang C, Jun F, Jiong-Ming Z. Karyotypes of Diploid and Triploid *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). J. Shellfish Res. 2008; 27 (2): 297-300.
57. Robert T, Dillon Jr. Geografic distance, environmental difference, and divergence between isolated populations. Sys. Biol. 1984; 33 (1): 69-82.